

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

06.09.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

2003年10月10日

出願番号  
Application Number:  
[ST. 10/C]:

特願2003-352669

[JP2003-352669]

出願人  
Applicant(s):

独立行政法人 科学技術振興機構

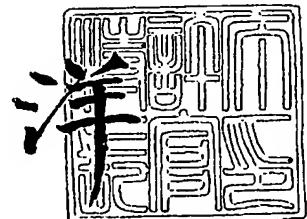
RECEIVED
21 OCT 2004
WIPO PCT

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年10月 8日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 200310028  
【特記事項】 特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特許出願  
【提出日】 平成15年10月10日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C08L 55/00  
A61K 9/51

【発明者】  
【住所又は居所】 茨城県守谷市けやき台3-5-17  
【氏名】 長崎 幸夫

【発明者】  
【住所又は居所】 東京都中野区上鷺宮5-17-22  
【氏名】 片岡 一則

【発明者】  
【住所又は居所】 神奈川県横浜市中区西竹之丸85-1-214  
【氏名】 高橋 唯仁

【発明者】  
【住所又は居所】 埼玉県北葛飾郡鷺宮町上内1221-1  
【氏名】 石井 武彦

【特許出願人】  
【識別番号】 503360115  
【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構

【代理人】  
【識別番号】 100060782  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 小田島 平吉

【選任した代理人】  
【識別番号】 100094293  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 藤井 幸喜

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 019666  
【納付金額】 21,000円  
【その他】 同日付で新規性の喪失の例外証明書提出書を提出しています。

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1

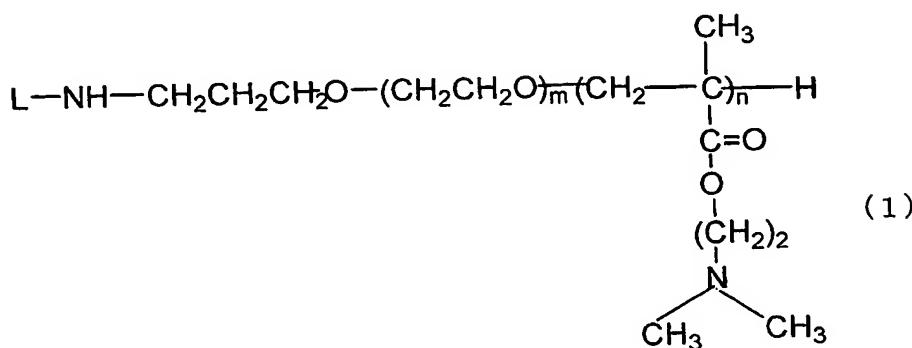
## 【書類名】特許請求の範囲

## 【請求項1】

微小粒子を用いる凝集反応を利用する生物学的水性試料中に存在する疑いのある被検体の検出方法であって、

(a) 該微小粒子が下記一般式(1)：

【化1】



(上式中、Lは被検体と生物学的な特異的結合を形成することができる残基を表し、mは1～10,000の整数であり、そしてnは10～20,000の整数である。)で表されるブロックコポリマーから形成され、かつ半導体の超微粒子を内包する微小粒子であり、そして

(b) 凝集反応は該微小粒子と、生物学的水性試料中に存在する疑いのある被検体および夾雜タンパク質とが、静電的相互作用により結合されうる条件下で実施され、次いでこうして形成される凝集物を含有する水性試料中に塩が添加されることにより静電相互作用が弱まり、該微小粒子と夾雜タンパク質の静電的な相互作用による結合が選択的に開裂される工程、および

(c) 工程(b)後に残存する凝集物の存在を検出し、検出された凝集物の存在を被検体の存在の指標とする、ことを特徴とする検出方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】生物学的被検体の高速検出方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、被検体の生物学的検出方法に関し、より具体的には凝集反応を利用する被検体の検出方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ラテックスまたは赤血球等に抗原または抗体を感作しておき、生物学的流体中の被検体（タンパク質または特定の有機物質）を介する凝集反応を利用して検出する方法は、当該技術分野で周知である。このようなラテックスとしては、例えばポリスチレンラテックスが広く用いられており、粒径、粒子表面上の官能基（カルボキシル基等）に基づくファクターが被検体の検出速度もしくは検出感度（被検体以外の物質の非特異吸着等）にいかなる影響を及ぼすか、等についても検討されている（例えば、非特許文献1参照。）。

【0003】

しかし、検出速度に大きな影響を及ぼすラテックス粒子の被検体を介する凝集は、拡散律速であるのだから時間がかかる。そのため、ラテックス粒子中に磁性粒子を担持させ、磁力によってラテックス粒子の凝集もしくは沈殿速度を高めるような試みがなされてきた（例えば、非特許文献2参照。）。

【0004】

なお、上記の非特許文献1に記載されているようなポリスチレンラテックス粒子等は非特異凝集を起こしやすく、分散安定性に若干劣る場合もある。また、かような粒子表面への被検体以外の夾雑タンパク質の非特異吸着も起こりやすい。そのため、本発明者の一部は、生物学的試料中の被検体を検出するための量子ドットとして、例えば、ポリエチレングリコール（以下、PEGと略記もする。）（または、ポリ（エチレンオキシド））鎖が、半導体超微粒子を内包する微小粒子の表面を覆う（または、水性溶液中でモビリティの高いPEGが複数のブラシ状構造をとる。）複合粒子を提供した（特許文献1参照。）。しかし、このような量子ドットは夾雫タンパク質の非特異吸着を防止するだけでなく、一般に数百ナノメーターまでの粒径をもち、しかもモビリティの高いPEGが表面に存在するため水性溶液中で極めて安定な分散状態をもたらすので、凝集反応を利用する被検体の迅速な検出系で用いるのに、必ずしも適するものとは考えられなかった。

【特許文献1】国際公開（WO）第02/056020号パンフレット（第16～17頁）

【非特許文献1】日本臨床検査自動化学会会誌第12巻、第2号 121-124, 1987 (第122頁)

【非特許文献2】J. Applied Polymer Science Vol. 50, 765-776, 1993

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の目的は、生物学的試料中の夾雫タンパク質の非特異吸着を排除するとともに、磁力等を用いることなく、迅速な被検体の検出方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、例えば、特許文献1に記載されているようなモビリティの高いPEG鎖が表面に存在し、半導体超微細粒子を内包した微小粒子が、各種タンパク質等を含有する水溶液中である一定のタンパク質との静電相互作用により迅速に凝集することを見出した。

【0007】

また、例えば、被検体として特定のタンパク質としてのアビジンを他の夾雫タンパク質

と一緒に含有する生物学的水性試料中では、該微小粒子が、表面に生物学的な特異結合を形成する構成員の一方の構成員（例えば、ビオチン誘導体の残基）を担持する場合、他の構成員であるアビジンも夾雜タンパク質とともに迅速な微小粒子の凝集に関与することを見出した。こうして形成された凝集物を、前記の生物学的な特異結合は開裂しないが、静電相互作用をよわめる条件下に置く（例えば、塩の添加によりイオン強度を高める）と、現に、生物学的な特異結合のみを選択的に残存させうる（すなわち、特異結合のみを介した凝集物だけが選択的に残存しうる）ことを見出した。以上の静電的相互作用および生物学的な特異結合による凝集物の形成、その後の静電相互作用による凝集体のみの選択的な解凝集の総時間は極めて短時間でよいことが確認できた。

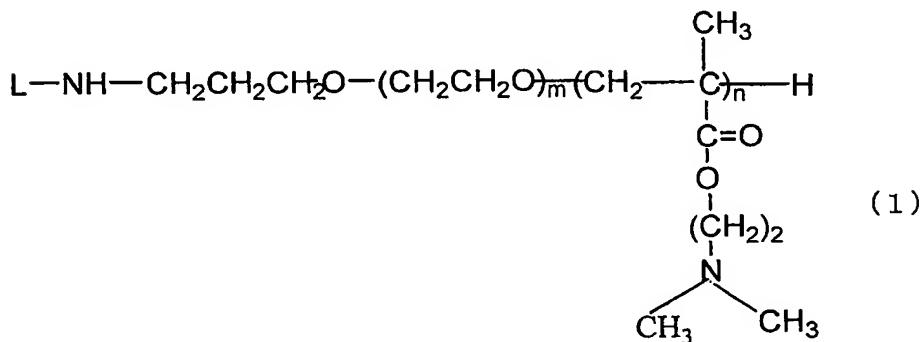
## 【0008】

本発明はかかる知見に基づいて完成されたものである。したがって、本発明によれば、微小粒子を用いる凝集反応を利用する生物学的水性試料中に存在する疑いのある被検体の検出方法であつて、

(a) 該微小粒子が下記一般式(1)：

## 【0009】

## 【化1】



## 【0010】

(上式中、Lは被検体と生物学的な特異的結合を形成することのできる残基を表し、mは1～10,000の整数であり、そしてnは10～20,000の整数である。)で表されるブロックコポリマーから形成され、かつ半導体の超微粒子を内包する微小粒子であり、そして

(b) 凝集反応は該微小粒子と、生物学的水性試料中に存在する疑いのある被検体および夾雜タンパク質とが、静電的相互作用により結合されうる条件下で実施され、次いでこうして形成される凝集物を含有する水性試料中に塩が添加されることにより静電相互作用が弱まり、該微小粒子と夾雜タンパク質の静電的な相互作用による結合が選択的に開裂される工程、および

(c) 工程(b)後に残存する凝集物の存在を検出し、検出された凝集物の存在を被検体の存在の指標とする、

ことを特徴とする検出方法が、提供される。

## 【発明の効果】

## 【0011】

本発明の検出方法によれば、生物学的水性試料中の夾雜タンパク質による影響を殆ど受けることなく、高感度かつ、迅速な被検体（タンパク質、その他の作用物質）の検出が可能になる。

## 【0012】

以下、本発明をより具体的に説明する。

## 【0013】

本発明の方法に従って検出できる被検体は、生物学的な特異結合の形成に関与しうる構

成員、または化合物もしくは分子種のいずれか一方のものであればよく、高分子量の抗体、受容体タンパク質や多糖のような物質、他方、低分子量のハプテン、または抗原となり得る作用物質（各種医薬、毒物等）を初め、ホルモン、神経ペプチド等のすべてを包含する。このような化合物としては天然物もしくはその修飾体、半合成化合物、および化学合成物等であることができる。このような化合物を含む試料としては、生物学的流体（例えば、血液、尿、唾液またはこれらの希釀溶液もしくは濃縮液を包含する処理液、等、ならびに作用物質の生物学的または化学的変換の反応混合物等を含有する水溶液）が挙げられる。

#### 【0014】

本発明に関しては、これらの生物学的流体および化学合成混合物を含有する水溶液をも生物学的水性試料と称している。本発明に従えば、被検体がハプテン、抗原、低分子ペプチドホルモンであっても、それらが例えば、対応する抗体または受容体タンパク質に対して多官能性を有する限り、本発明における被検体となり得る。理論に拘束されるものでないが、試料中に存在しうる夾雜タンパク質等が静電的相互作用を介して微小粒子に結合する際に、これらの被検体も該夾雜タンパク質と一緒に移動することができ、しかも被検体は微小粒子に担持された該被検体と生物学的な特異結合を形成する構成員の他の一員の残基に結合しうる。勿論、被検体がタンパク質であるときも、該タンパク質は他の夾雜タンパク質と一緒に移動するとともに前記構成員の他の一員の残基に結合しうる。限定されるものでないが、かかる構成員の一員は、抗原もしくはハプテンと抗体、ホルモンもしくは神経伝達物質とそれに対する受容体タンパク質、基質と酵素等の構成員のペアのいずれかであることができ、タンパク質には糖タンパク質、リボタンパク質等も包含される。

#### 【0015】

したがって、本発明によれば上記の一般式（1）におけるLは、例えば、抗原もしくはハプテンと抗体、ホルモンもしくは神経伝達物質とそれに対する受容体タンパク質、基質と酵素等の構成員のペアのいずれか一方の化合物に由来し、もう一方の化合物と特異的な結合を形成しうる残基であることができる。

#### 【0016】

本発明に従う、微小粒子（またはミクロスフェア）は、上記の一般式（1）で表されるブロックコポリマーまたは、通常はその前駆体（上記のLの残基に代わり、該残基を容易に導入することのできる官能基、例えば、保護されたホルミル基を有する。）を用いて高分子ミセル形成し、その後、または該ミセル形成中に半導体をミセル中に内包し、次いでLの残基を導入することにより再現性よく容易に作製できる。

#### 【0017】

本明細書で使用するところの半導体の「超微粒子」は、本発明の微小粒子内に内包される大きさのものをすべて包含するサイズの粒子を意味するが、例えば、直径が $1 \sim 20 \text{ nm}$ の範囲内にあることができる。例えば、これらの半導体超微粒子は半導体を構成する成分および／または粒径を選ぶことによって発光波長の異なる微小粒子も提供できる。

#### 【0018】

かような半導体の超微粒子を内包した微小粒子（またはミクロスフェアともいう）は、都合よくは、前記の高分子ミセルと半導体の超微粒子のゾルとを水性媒体中で混合搅拌することにより該半導体の超微粒子を高分子ミセル内に導入するか、または、例えば、周期律表のI IA族またはII IB族の元素の塩化物等の水溶液を上記ブロックコポリマーから高分子ミセルを形成する際の水溶液と混合搅拌して該元素を微小粒子に内包し、次いで例えば、VI IB族の元素とアルカリ金属との塩の水溶液またはH<sub>2</sub>Sと混合搅拌することにより、微小粒子内において、インサイチュー（in situ）で半導体を形成することにより作製することもできる（例えば、特許文献1に記載の方法をそのまま、または若干修飾した方法によることができる。）。

#### 【0019】

こうして形成された、該超微粒子が内包されたブロックコポリマーの微小粒子は、水溶液中で安定に分散され、そして微小粒子全体は、中性のpH付近で、高分子ミセルのコア部

分に主として存在する第三級アミノ基に起因して正のわずかな電荷を帯びうる。このような微小粒子を適當なpHに調節した生物学的流体（例えば、血清）に加えると、図1(a)の概念図に示されるように、該微小粒子は、微小粒子の荷電と反対荷電を有する夾雜タンパク質等（薄く塗りつぶした中位の円で表す）および微小粒子表面の生物学的な特異結合を形成する一員（Yで表されている）と特異結合する被検体（黒で塗りつぶした小さな円で表す）を瞬時に結合または吸着する（なお、通常、これらの結合は微小粒子間の凝集物の形成をもたらす。）。次いで、かような系に塩を添加すると、図1(b)の概念図に示されるように、特異結合のみを残存させることができる。

#### 【0020】

図1(a)に示すようなタンパク質および被検体の結合または吸着のための条件は、一般式(1)のLの種類、夾雜タンパク質等の種類によって変動するので、当業者は、被検体の正式な検出試験を実施する前に、予め、小企規の予備試験を行って、最適条件を選定するのが望ましい。しかし、通常、生物学的水性試料のpHを、6.5～10.0

に調節することにより、上記の結合または吸着を引き起こすことができる。このような結合または吸着は迅速に起こる。次に、かのような結合または吸着の中から被検体の特異結合のみを残す（該微粒子と夾雜タンパク質の静電的な特異結合を選択的に開裂させる）条件も、上記のような小企規の予備試験を行って、最適条件を選定するのが望ましい。しかし、荷電性基が三級アミノ基である場合、通常、塩（NaCl、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>等）の濃度を0.1～2Mに調節することにより、静電相互作用を弱め、夾雜タンパク質の結合を開裂することができる。こうして夾雜タンパク質は微小粒子から脱離し、微小粒子の凝集物は、解凝集を起こす。このような脱離または解凝集は数秒間で完了するので、本発明によれば、数十ナノメートルサイズの微小粒子を用いた場合でも、秒単位での被検体の検出ができる。また、以上の工程は、被検体の性質に応じて、室温、または生物学的水性試料が凍らない低温から80℃までの温度で実施できる。

#### 【0021】

検出には、例えば、図1(a)の結合または吸着が起こった状態と図1(b)の選択的な脱離または解凝集が起こった状態を識別できる方法であれば、いかなる方法を用いてもよい。一般には、微小粒子に内包された半導体の超微粒子間の蛍光エネルギー移動(FRET)の変化を利用して、図1(a)で示されるような状態と図1(b)で示されるような状態を識別できる。こうして、前記の変化量は、被検体が生物学的流体に存在する量に相当するので、被検体の存在の指標としうる。

#### 【0022】

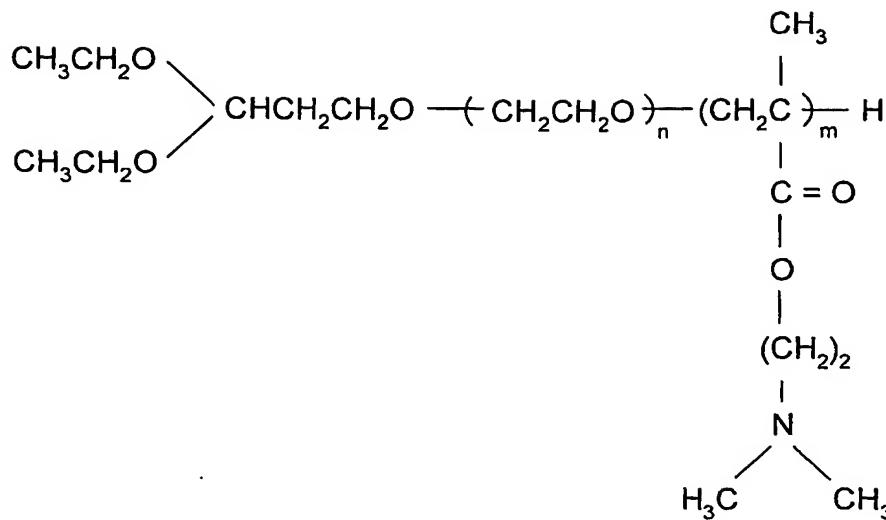
以下、具体例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明をこれらに限定することを意図するものでない。当業者にとって、本発明に内包されるいづれの態様も、上記の本発明についての記述に照らして、以下の例を参照すれば、明確になるであろう。

＜製造例1＞ ブロック共重合体(P E G / P A M A = 5 0 0 0 / 1 4 0 0 0)の脱保護、これを用いたC d S 内包微小粒子の調製

この製造例では、重合体(下記式で示される  $\alpha$ -acet al - P E G - P A M A)：

#### 【0023】

## 【化2】



## 【0024】

(上述の Kataoka et al., Macromolecules 1999, 32, 6892–6894 に記載の方法に従って得られた。PEG Mw=5000 g/mol、PAMA (ポリ [(2-N,N-ジメチルアミノ)エチルメタクリレート]) Mw=14,000 の 0.5 g に酢酸水溶液 22 ml を加え、35 °C で 5 時間攪拌し末端のアセタール基をアルデヒド基 (ホルミル) に変換した。反応後、10M NaOH の 37.4 ml を用いて中和し、ビオチンヒドラジド (PIERCE 社製) の  $1.0 \times 10^{-3}$  mol (0.038 g) を加え 2 時間攪拌し反応させた。この溶液に NaBH4 を  $2.6 \times 10^{-4}$  mol 加えて還元した後、未反応のピオチン、NaBH4 を除去するため 1 日間水透析を行った (水交換 3 回)。透析終了後、凍結乾燥によりポリマーを回収し、<sup>1</sup>H-NMR 測定を行い、ビオチンの導入を確認した。

## 【0025】

バイアルに超純水 8 ml、前記で調製したピオチン-PEG-PAMA ブロック共重合体  $2.465 \times 10^{-6}$  mol (0.048 g) を入れ、30 分間攪拌し溶解させた。その後、スターラーで攪拌中に CdCl<sub>2</sub> 溶液、Na<sub>2</sub>S 溶液 (それぞれ  $2.0 \times 10^{-5}$  mol) を順に添加し、1 時間攪拌を行った。サンプルは暗所で保管し、1 日後、蛍光スペクトル測定を行った。

## 【0026】

こうして得られた微小粒子 (ピオチン化 PEG-b-PAMA-CdS ナノ粒子ともいう) について、LEZA-600 (大塚電子社) によって表面ゼータ電位を測定したところ、pH = 7 以下で正の電荷を示した (微小粒子の水溶液を 0.5 mg/mL となるよう希釈。)。

## 【実施例 1】

## 【0027】

この実施例では、上記の製造例 1 に従って得られるピオチン化 PEG-b-PAMA-CdS を含有する溶液にテキサスレッドーストレプトアビジン (Texas SA ともいう) を添加した場合とテキサスレッドーウシ血清アルブミン (BSA) を添加した場合において、それぞれの添加溶液に NaCl を添加し、その後のエネルギー移動度を観察する。各試料の濃度は次のとおりである。

## 【0028】

【表1】

	CdS [( $\times 10^{-5}$ )mol/l]	Tex SA [( $\times 10^{-5}$ )mol/l]	NaCl (mol/l)
時間0のサンプル	191	2.95	0
NaClを添加したサンプル	191	2.95	0.15

&lt;エネルギー移動度へのNaCl添加効果&gt;

## 【0029】

超遠心による精製後のビオチン化PEG-b-CdSナノ粒子溶液を8倍希釈し、そのうち0.5mlを各エッペンドルフチューブにとり、Tex SA (Texas Red BSAは発光強度が等しくなるように予め調整したもの) 溶液を各26μl添加した。ピベッティングでよく混合した後、0.5mlを分取し、石英マイクロセルを用いて蛍光スペクトルを測定した。そこにNaCl水溶液(3.3mol/l)を0.05ml添加し、直後より経時的に蛍光スペクトル測定を行った。(最終的な濃度はCdS;  $1.90 \times 10^{-3}$  mol/l、Tex-SA;  $2.9 \times 10^{-5}$  mol/l)

結果を図2に示す。

## 【0030】

図2から、pH=7.4でビオチン化-PEG-CdSナノ粒子とTex SAあるいはTex-BSAを混合させると瞬間的に620nmの発光が確認される。NaCl添加後、10%程度の体積増加があるため、Tex SAの系では発光強度も10%程度減少している。一方で、Tex-BSAの系ではSAと比べて明らかに発光の減少が確認された。イオン強度に応じて発光強度の減少幅も大きくなっていることから、電荷の中和による静電相互作用を介した非特異吸着が抑制されたものと判断できる。このようにこれらの操作に於いて、数秒程度の混合時間で分子認識が定量できる。

## 【産業上の利用可能性】

## 【0031】

本発明に従えば、数秒程度の混合時間で生物学的な特異結合を形成するいづれかの一員の分子が、微小粒子の凝集反応を介して提出できるので、医療診断業等で利用できる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0032】

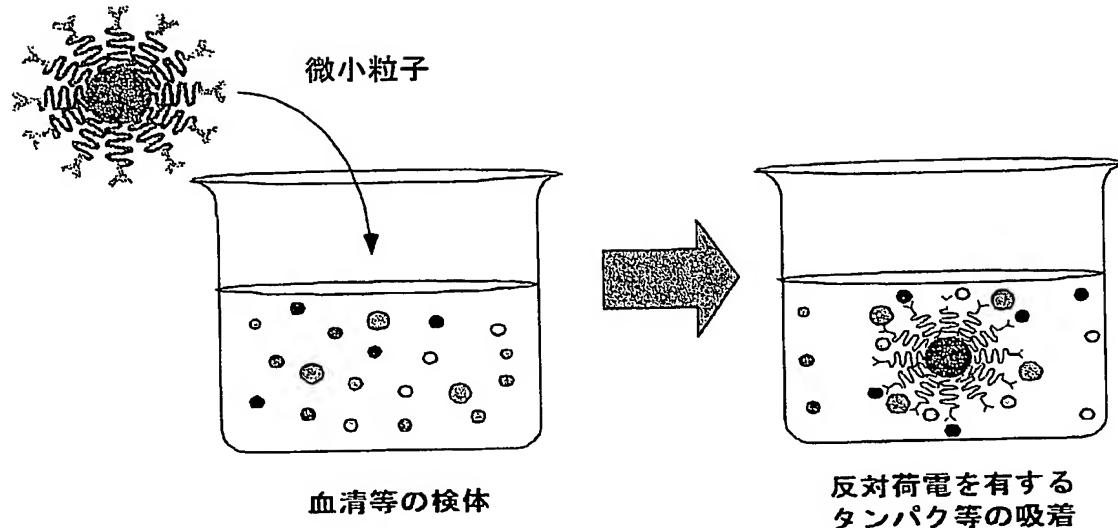
【図1】本発明に従う、静電相互作用による結合の形成(a)と、生物学的な特異結合の選択的な残存(b)についての概念図である。

【図2】水溶液中のCdS内包微小粒子のエネルギー移動度に対するNaClの添加効果を表のグラフである。○: Tex RSA 0.30M NaCl添加、●: Tex SA 0.30M NaCl添加。

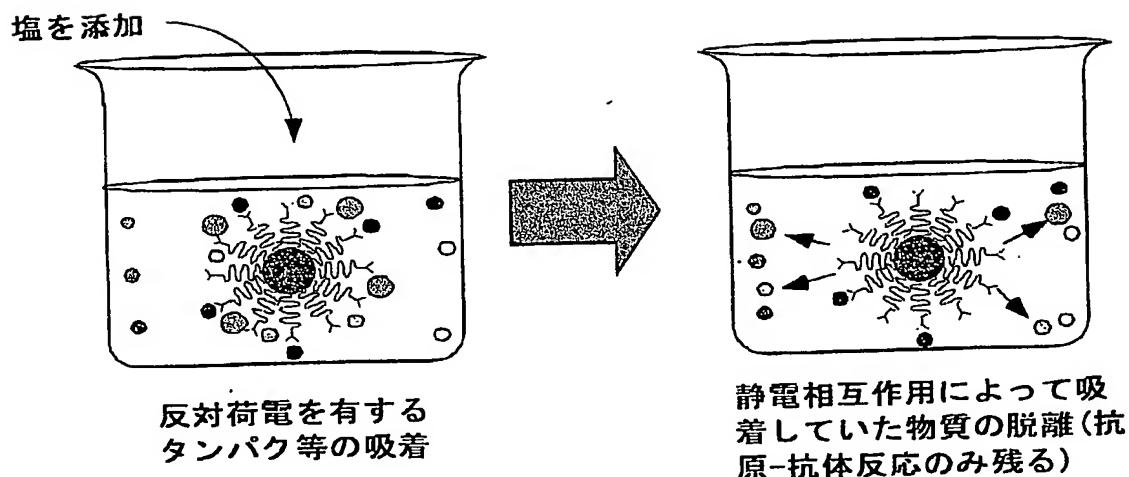
【書類名】図面

【図1】

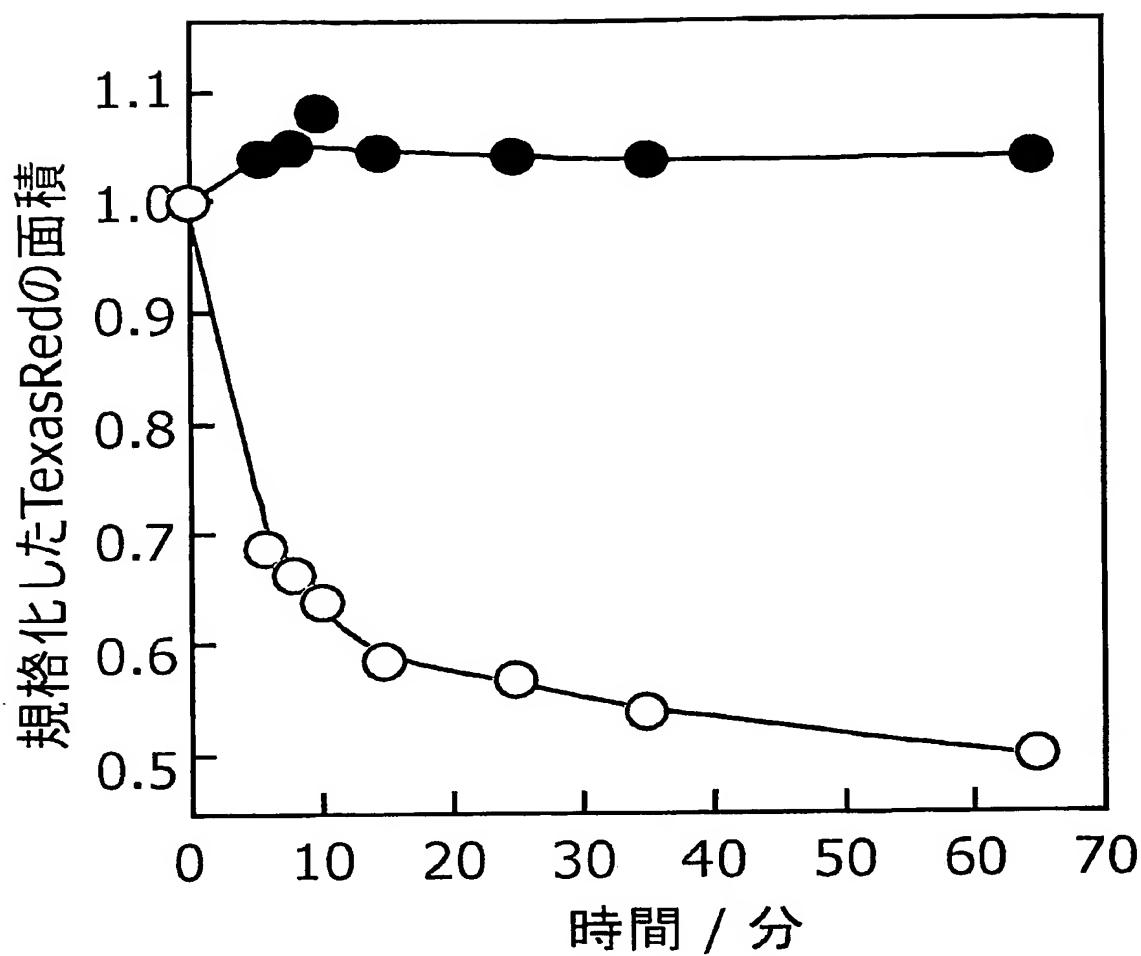
(a)



(b)



【図2】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 凝集反応を利用する迅速、かつ高感度の被検体の検出方法。

【解決手段】 半導体を内包した、コアに三級アミノ基を有し、シェルに親水性ポリエチレングリコール鎖を有する半導体内包微小粒子を用い、該微小粒子表面の特定の残基と生物学的試料中の被検体との間で生物学的な特異結合の形成を行うと同時に、夾雜タンパク質等と該粒子との静電的相互作用により凝集物を得、次いで塩濃度を高めて後者の結合のみを開裂する工程を含んでなる被検体の検出方法。

【選択図】 なし

特願 2003-352669

出願人履歴情報

識別番号 [503360115]

1. 変更年月日 2003年10月 1日

[変更理由] 新規登録

住所 埼玉県川口市本町4丁目1番8号  
氏名 独立行政法人 科学技術振興機構